

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.11.03

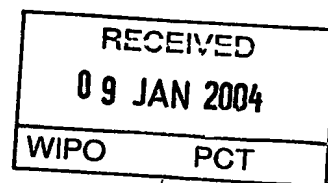
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年11月14日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-330787
[ST. 10/C]: [JP2002-330787]

出 願 人
Applicant(s): アークレイ株式会社

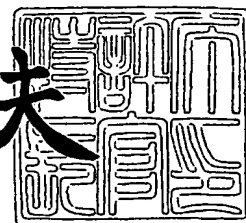


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 R7002

【提出日】 平成14年11月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G11B 7/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 中嶋 真也

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の色素が混合された試料に波長の異なる光を照射したときの透過光又は放射光の強度を前記色素毎に測定する測定装置であって、

波長の異なる光を前記試料に照射可能な光源ユニットと、前記透過光又は前記放射光を受光し、受光した光の強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部とを有し、

前記演算部は、

前記複数の色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって波長の異なる光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記透過光又は前記放射光の強度を前記色素毎に算出する蛍光測定装置。

【請求項 2】 励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定装置であって、

波長の異なる光を前記試料に照射可能な光源ユニットと、前記蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部とを有し、

前記演算部は、

前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する蛍光測定装置。

【請求項 3】 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に 1 ～ n の番号を付し、前記光源ユニットが k (1, 2, …, n) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を X_k 、前記 k 番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k としたときに、前記補正係数が下記数 1 を満

たす行列 (a_{ij} ($i=1,2,\dots,n; j=1,2,\dots,n$)) であり、

前記演算部は、下記数 1 に前記行列 (a_{ij}) と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出する請求項 2 記載の蛍光測定装置。

【数 1】

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \cdots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \cdots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \cdots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix}$$

【請求項 4】 前記光源ユニットが照射する光の光量を検出して前記演算部に信号を出力する光量モニタを有し、

前記演算部は、前記光量モニタが出力した信号に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正する請求項 3 記載の蛍光測定装置。

【請求項 5】 波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定方法であって、

補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する工程を有し、

前記補正係数は、

前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたものである蛍光測定方法。

【請求項 6】 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に $1 \sim n$ の番号を付し、前記光源ユニットが k ($1, 2, \dots, n$) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を X_k 、前記 k 番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k としたときに、前記補正係数が下記数 2 を満

たす行列 (a_{ij} ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, n$)) であり、

下記数 2 に前記行列 (a_{ij}) と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出する請求項 5 記載の蛍光測定方法。

【数 2】

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \cdots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \cdots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \cdots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix}$$

【請求項 7】 前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正する請求項 6 記載の蛍光測定方法。

【請求項 8】 波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度をコンピュータに測定させるプログラムであって、

補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出するステップを有し、

前記補正係数は、

前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたものであるプログラム。

【請求項 9】 前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に $1 \sim n$ の番号を付し、前記光源ユニットが k ($1, 2, \dots, n$) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を X_k 、前記 k 番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k としたときに、前記補正係数が下記数 3 を満たす行列 (a_{ij} ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, n$)) であり、

下記数 3 に前記行列 (a_{ij}) と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出する請求項 8 記載のプログラム。

【数 3】

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \cdots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \cdots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \cdots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix}$$

【請求項 10】 前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正する請求項 9 記載のプログラム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複数の色素が混合された試料に、各色素に対応する波長の光を照射した場合における、色素毎の透過光又は放射光の強度を測定する測定装置に関し、特に、複数の蛍光色素が混合された試料に、各蛍光色素の励起波長の光を照射し、この光によって励起された蛍光を測定する蛍光測定装置及び蛍光測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、蛍光測定、吸光度測定、又は反射率測定を用いて、各種の成分分析や遺伝子診断等が行なわれている。例えば、蛍光測定を用いた成分分析では、色素（蛍光色素）を混合した試料に光を照射し、この光により励起された蛍光の蛍光強度を測定することによって、色素（蛍光色素）が標識された物質が検出される。

【0003】

吸光度測定を用いた成分分析では、色素を混合した試料に、色素に対応した波長の光を照射し、このときの透過光の強度を測定して吸光度を算出することにより、色素が標識された物質が検出される（例えば、特許文献 1 参照）。反射率測

定を用いた成分分析では、透過光の代わりに散乱光の強度を測定して反射率を算出することにより、色素が標識された物質が検出される。

【0004】

また、このような成分分析によって複数の物質を検出する場合は、検出対象となる物質に応じて、種類の異なる複数の色素が試料に混合され、各色素に対応する光が別々に試料に照射される。

【0005】

例えば、蛍光測定を用いる場合では、励起波長及び蛍光波長がそれぞれ異なる複数の色素（蛍光色素）が混合された試料に、各色素の励起波長の光を別々に照射し、色素毎の蛍光強度を測定することによって成分分析が行なわれる（例えば、特許文献2参照）。

【0006】

また、吸光度測定を用いる場合では、吸収波長がそれぞれ異なる複数の色素が混合された試料に、各色素の吸収波長の光を別々に照射し、透過光の強度を色素毎に測定することによって成分分析が行なわれる。

【0007】

【特許文献1】

特開平9-21749号公報

【特許文献2】

特表2000-503774号公報

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、通常、色素の励起波長や吸収波長、反射波長はある程度の幅を有している。このため、蛍光測定を用いる場合は、使用されている色素（蛍光色素）間で励起ピーク波長が近接していると、ある色素がその励起波長の光によって励起したときに、他の色素まで励起してしまう場合がある。この場合、得られる蛍光強度は、励起した各色素の蛍光強度の合成値となってしまう、正確な成分分析や遺伝子診断等を行なうのが困難となる。

【0009】

また、吸光度測定や反射測定を用いる場合であっても同様であり、得られる透過光や散乱光の強度が、各色素の透過光や散乱光の強度の合成値となり、正確な成分分析や遺伝子診断等を行なうのが困難となる。

【0010】

本発明の目的は、透過光や放射光の強度の合成値から色素毎の実際の強度を分離して測定できる測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために本発明にかかる測定装置は、複数の色素が混合された試料に波長の異なる光を照射したときの透過光又は放射光の強度を前記色素毎に測定する測定装置であって、波長の異なる光を前記試料に照射可能な光源ユニットと、前記透過光又は前記放射光を受光し、受光した光の強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部とを有し、前記演算部は、前記複数の色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって波長の異なる光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記透過光又は前記放射光の強度を前記色素毎に算出することを特徴とする。

【0012】

上記目的を達成するために本発明にかかる蛍光測定装置は、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定装置であって、波長の異なる光を前記試料に照射可能な光源ユニットと、前記蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットと、演算部とを有し、前記演算部は、前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって、前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて算出される補正係数を用いて、前記試料から放射され

る蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出することを特徴とする。

【0013】

上記本発明にかかる蛍光測定装置においては、前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に1～nの番号を付し、前記光源ユニットがk (1, 2, …, n) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を X_k 、前記k番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k としたときに、前記補正係数が下記式(1)を満たす行列(a_{ij} ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, n$)) であり、前記演算部は、下記式(1)に前記行列(a_{ij})と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出するのが好ましい態様である。

【0014】

【数4】

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} & \cdots & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} & \cdots & a_{3n} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} & \cdots & a_{4n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & a_{n4} & \cdots & a_{nn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ \vdots \\ X_n \end{bmatrix} \quad \dots \dots (1)$$

また、上記本発明にかかる蛍光測定装置においては、前記光源ユニットが照射する光の光量を検出して前記演算部に信号を出力する光量モニタを有し、前記演算部は、前記光量モニタが出力した信号に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正するのが好ましい態様である。

【0015】

次に、上記目的を達成するために本発明にかかる蛍光測定方法は、波長の異なる光を照射可能な光源ユニットと、蛍光色素による蛍光を受光し、受光した前記蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニットとを用いて、励起波長の異なる複数の蛍光色素が混合した試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を測定する蛍光測定方法であって、補正係数を用いて、前記試料から放射される蛍光の前記蛍光色素毎の蛍光強度を算出する工程を有し、前記補正係数は、前記複数の蛍光色素のいずれか一つが混合され、且つ、混合された蛍光色素

が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、前記光源ユニットによって、前記複数の蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに前記受光ユニットが出力する電気信号に基づいて、算出されたものであることを特徴とする。

【0016】

上記本発明にかかる蛍光測定方法においては、前記試料に混合される前記複数の蛍光色素に1～nの番号を付し、前記光源ユニットがk (1, 2, …, n) 番の蛍光色素の励起波長の光を前記試料に照射したときに前記受光ユニットが出力する前記電気信号の出力値を X_k 、前記k番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k としたときに、前記補正係数が上記式(1)を満たす行列(a_{ij} ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, n$)) であり、上記式(1)に前記行列(a_{ij})と前記出力値 $X_1 \sim X_n$ とを代入して、前記蛍光強度 $Y_1 \sim Y_n$ を前記蛍光色素毎の蛍光強度として算出するのが好ましい態様である。

【0017】

更に、上記本発明にかかる蛍光測定方法においては、前記光源ユニットが照射した光の光量に基づいて、前記出力値 $X_1 \sim X_n$ 又は行列要素 $a_{11} \sim a_{nn}$ を補正するのが好ましい態様である。

【0018】

また、本発明は、上記の本発明にかかる蛍光測定方法を具現化するためのプログラムであっても良い。このプログラムをコンピュータにインストールして実行することにより、本発明にかかる蛍光測定方法を実行できる。なお、本明細書において「色素」には、吸光度測定や反射率測定で用いられる色素に加え、蛍光測定で用いられる蛍光色素も含まれる。「色素」のうち蛍光色素のみを意味する場合は「蛍光色素」とする。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法の一例について図面を参照しながら説明する。まず、本発明の蛍光測定装置の構成について図1を用いて説明する。図1は、本発明の蛍光測定装置の一例を示す構成図である。

【0020】

図1に示す本発明の蛍光測定装置は、試料6から放射される蛍光の蛍光色素毎の蛍光強度を測定する装置である。図1に示すように、本発明の蛍光測定装置は、光源ユニット1、受光ユニット2、演算部3、表示部4、反応容器5及び光量モニター7を備えている。

【0021】

反応容器5には、複数の蛍光色素が混合された試料6が添加される。図1の例では、試料には下記の表1に示す4種類の蛍光色素が混合されている。なお、本発明において試料に混合される蛍光色素は下記の表1に示すものに限定されず、その数も限定されるものではない。本発明では、蛍光測定の目的等に応じて、必要な数の適切な蛍光色素を選択できる。

【0022】

【表1】

蛍光色素名	FAM	JOE	TAMRA	ROX
励起ピーク波長 [nm]	470	500	530	560
蛍光ピーク波長 [nm]	520	550	580	610

光源ユニット1は、波長の異なる光を照射可能に構成されており、試料に混合される蛍光色素の励起波長の光を照射することができる。図1の例では、光源ユニット1は、発光素子11a～11dと、ダイクロイックミラー12a～12dと、全反射ミラー13とを備えている。

【0023】

発光素子11a～11dは、演算部3の指示に応じて発光し、試料6に混合された蛍光色素を励起させるための光を出射する。発光素子11a～11dは、各発光素子の出射方向が平行となるように配置されている。発光素子11a～11dが出射する光の波長は、互いに異なっており、試料に混合されている蛍光色素のいずれかの励起波長に設定されている。具体的には、発光素子11aはFAMの励起波長の光を、発光素子11bはJOEの励起波長の光を、発光素子11cはTAMRAの励起波長の光を、発光素子11dはROXの励起波長の光を出射

する。

【0024】

ダイクロイックミラー12a～12dは、特定波長以下の波長の光だけを反射する（ハイパス）特性を有しており、ダイクロイックミラー12a、12b、12c、12dの順で、反射可能な光の最大波長が大きくなっている。

【0025】

このため、発光素子11a～11dそれぞれから出射された光は、同一の光路を通して全反射ミラー13に入射し、これに反射されて反応容器5に入射する。また、発光素子11a～11dが出射した光の光量は、光量モニタ7によってモニタされる。光量モニタ7は、発光素子11a～11dが出射した光の光量を検出して、演算部3に信号を出力する。

【0026】

なお、図1の例では、使用される蛍光色素が上述したように4種類であるため、光源ユニット1を構成する発光素子の数も4つである。また、発光素子の数に合わせてダイクロイックミラーの数も4つである。但し、本発明においては、発光素子及びダイクロイックミラーの数はこれに限定されず、使用される蛍光色素の数に応じて決定される。また、発光素子11a～11dとしては、発光ダイオードや半導体レーザを用いるのが好ましいが、キセノンランプやハロゲンランプを用いることもできる。

【0027】

受光ユニット2は、反応容器5から放出された蛍光を受光し、受光した蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する。図1の例では、受光ユニットは、受光素子14a～14dと、ダイクロイックミラー15a～15dと、全反射ミラー16とを備えている。

【0028】

図1の例では、ダイクロイックミラー15a～15dは、特定波長以上の波長の光だけを反射する（ローパス）特性を有したものであり、ダイクロイックミラー15d、15c、15b、15aの順で、反射可能な光の最小波長が大きくなっている。受光素子14a～14dは、フォトダイオードであり、一のダイクロ

イックミラーの反射光が一の受光素子の受光面（図示せず）に入射するように配置されている。

【0029】

このため、反応容器 5 から放射された蛍光は、全反射ミラー 16 で反射された後、その波長に応じてダイクロイックミラー 15 a～15 d のいずれかで反射され、対応する受光素子に入射することになる。この結果、各受光素子から、蛍光の蛍光強度に応じた電気信号が演算部 3 に出力される。

【0030】

演算部 3 は、受光ユニット 2 から出力された電気信号に基づいて蛍光強度を算出する。算出された結果は、表示部 4 に表示される。表示部 4 は、液晶表示装置や CRT 等である。

【0031】

次に、本発明の蛍光測定方法について図 2～図 4 を用いて説明する。なお、本発明の蛍光測定方法は、図 1 に示す蛍光測定装置を動作させることによって実行することができる。このため、以下の説明では、本発明の蛍光測定装置の動作について説明する。

【0032】

図 2 は、図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる蛍光測定処理を示すフローチャートである。図 2 に示すように、最初に、蛍光測定装置の演算部 3 は、補正係数が算出されているかどうか判定する（ステップ S1）。補正係数は、複数の蛍光色素が混合された試料に各蛍光色素の励起波長の光を照射したときに受光ユニット 2 が出力する電気信号から、蛍光色素毎の蛍光強度を算出するための係数である。

【0033】

なお、本発明における「蛍光色素毎の蛍光強度」とは、従来の蛍光測定で得られる合成値を言うのではなく、試料に光を照射したときに、その光の波長と励起波長が一致する蛍光色素が放射する蛍光のみの蛍光強度をいう。即ち、本発明においては、後述するように上記の補正係数を用いることで、合成値から実際の蛍光強度を分離している。

【0034】

図2の例では、補正係数は上記式(1)を満たす行列(a_{ij})である。但し、本例では、上記したように試料に混合される蛍光色素は4種類である。このため、試料に混合される4種類の蛍光色素に、励起波長の短い順に1～4の番号を付し、光源ユニット1がk(1,2,3,4)番の蛍光色素の励起波長の光を試料に照射したときに受光ユニット2が出力する電気信号の出力値を X_k 、k番の蛍光色素の蛍光強度を Y_k とすると、補正係数は下記式(2)を満たす行列(a_{ij} ($i=1,2,3,4$; $j=1,2,3,4$))となる。

【0035】

【数5】

$$\begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & a_{14} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & a_{24} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & a_{34} \\ a_{41} & a_{42} & a_{43} & a_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \end{bmatrix} \quad \dots\dots(2)$$

ステップS1において補正係数が未だ算出されていないと判断した場合は、演算部3は補正係数算出処理を行ない(ステップS2)、その後、以下のステップS3を実行する。なお、ステップS2の補正係数算出処理の具体的な内容については、後述する。

【0036】

一方、ステップS1において補正係数が算出されていると判断した場合は、演算部3は、発光素子11a～11dそれぞれから光を出射させて光量モニタ7によって光量を測定し、測定した光量に変動があった場合は、後述の出力値 $X_1 \sim X_4$ を補正するための光量補正值を算出する(ステップS3)。なお、ステップS3の具体的な内容については、後述する。

【0037】

次に、演算部3は、蛍光強度を測定するため、光源ユニット1の各発光素子に試料への励起波長の光の照射を行なわせる(ステップS4)。次いで、演算部3は、受光ユニット2が出力する電気信号を受信し、その出力値 X_k ($k=1 \sim 4$)を取得する(ステップS5)。

【0038】

なお、図1～図4の例においては、受光ユニット2から出力された電気信号の出力値は、受光素子14a～14dが出力した電気信号の電流値をI/V変換し、これによって得られた電圧値を更にA/D変換して得られるデジタル値であるが、本発明はこれに限定されるものではない。受光ユニット2から出力された電気信号の出力値は、受光素子14a～14dが出力した電気信号の電流値をA/D変換して得られるデジタル値であっても良い。

【0039】

その後、演算部3は、出力値 $X_1 \sim X_4$ を全て取得しているかどうか判定する（ステップS6）。出力値 $X_1 \sim X_4$ を全て取得していない場合は、演算部3は、再度ステップS4及びS5を実行する。

【0040】

一方、出力値 $X_1 \sim X_4$ を全て取得している場合は、演算部3は、補正係数とステップS5で取得した出力値 $X_1 \sim X_4$ とを上記式(2)に代入して、各蛍光色素の蛍光強度 $Y_1 \sim Y_4$ を算出する（ステップS7）。なお、ステップS3において光量補正値が算出されている場合は、光量補正値によって補正した出力値 $X_1 \sim X_4$ 又は行列 $(a_{ij} \ (i=1,2,3,4; j=1,2,3,4))$ の行列要素を上記式(2)に代入する。

【0041】

以上により、蛍光測定処理が終了し、蛍光色素毎の蛍光強度が表示部4に表示される。このように、本発明の蛍光測定装置及び蛍光測定方法を用いれば、合成値から実際の蛍光強度を分離できるので、従来に比べて正確な蛍光測定を行なうことができる。

【0042】

次に、図3を用いて、図2のステップS2で示した補正係数算出処理について説明する。図3は、図1に示す蛍光測定装置で行なわれる補正係数算出処理を示すフローチャートである。

【0043】

補正係数算出処理は、複数の補正用試料を用いて行なわれる。補正用試料は、

試料に混合される蛍光色素のうちの一つのみが混合されたものであり、各補正試料には互いに異なる蛍光色素が混合されている。つまり、図3の例では、表1で示したように4種類の蛍光色素が試料に混合されるため、補正用試料も4種類必要である。

【0044】

また、補正係数算出処理は、上記式(2)を展開して得られる下記の式(3)～(6)を用いて行なわれる。

$$a_{11}Y_1 + a_{12}Y_2 + a_{13}Y_3 + a_{14}Y_4 = X_1 \cdots \cdots (3)$$

$$a_{21}Y_1 + a_{22}Y_2 + a_{23}Y_3 + a_{24}Y_4 = X_2 \cdots \cdots (4)$$

$$a_{31}Y_1 + a_{32}Y_2 + a_{33}Y_3 + a_{34}Y_4 = X_3 \cdots \cdots (5)$$

$$a_{41}Y_1 + a_{42}Y_2 + a_{43}Y_3 + a_{44}Y_4 = X_4 \cdots \cdots (6)$$

図3に示すように、最初に、演算部3は、補正用試料に各発光素子から光を照射し(ステップS11)、更に、このとき受光ユニット2が出力した電気信号の出力値を取得する(ステップS12)。次いで、演算部3は、この取得した出力値を上記式(3)～(6)に代入する(ステップS13)。

【0045】

次に、演算部3は、全ての補正用試料について出力値を取得できたかどうか判定する(ステップS14)。全ての補正用試料について出力値が取得できていない場合は、再度ステップS11～S13を実行する。全ての補正用試料について出力値が取得できている場合は、ステップS15を実行する。

【0046】

ステップS11～S13を具体的に説明する。演算部3は、まず、1番の蛍光色素(FAM)のみが混合された補正用試料に、光源ユニット1によって1番～4番の蛍光色素の励起波長の光を照射する。このとき出力された電気信号の出力値を蛍光色素の番号に対応させてF1～F4とすると、演算部3は、上記式(3)～(6)の $X_1 \sim X_4$ に、出力値F1～F4を代入する。また、この場合、補正用試料には1番の蛍光色素しか混合されていないので、上記式(3)～(6)において $Y_2 = Y_3 = Y_4 = 0$ (ゼロ)となる。よって、下記式(7)～(10)が得られる。

【0047】

$$a_{11}Y_1 = F1 \dots (7)$$

$$a_{21}Y_1 = F2 \dots (8)$$

$$a_{31}Y_1 = F3 \dots (9)$$

$$a_{41}Y_1 = F4 \dots (10)$$

【0048】

同様に、演算部3は、2番の蛍光色素（JOE）のみが混合された補正用試料、3番の蛍光色素（TAMRA）のみが混合された補正用試料、及び4番の蛍光色素（ROX）のみが混合された補正用試料それぞれについても、光源ユニット1によって1番～4番の蛍光色素の励起波長の光を照射し、出力される電気信号の出力値を取得し、取得した出力値を式（3）～（6）に代入する。なお、これらの場合の出力値を、それぞれJ1～J4、T1～T4、R1～R4とすると、下記式（11）～（22）が得られる。

【0049】

$$a_{12}Y_2 = J1 \dots (11)$$

$$a_{22}Y_2 = J2 \dots (12)$$

$$a_{32}Y_2 = J3 \dots (13)$$

$$a_{42}Y_2 = J4 \dots (14)$$

【0050】

$$a_{13}Y_3 = T1 \dots (15)$$

$$a_{23}Y_3 = T2 \dots (16)$$

$$a_{33}Y_3 = T3 \dots (17)$$

$$a_{43}Y_3 = T4 \dots (18)$$

【0051】

$$a_{14}Y_4 = R1 \dots (19)$$

$$a_{24}Y_4 = R2 \dots (20)$$

$$a_{34}Y_4 = R3 \dots (21)$$

$$a_{44}Y_4 = R4 \dots (22)$$

【0052】

次に、ステップS15において、演算部3は、ステップS13で得られた上記式(7)～(22)を用いて、上記式(2)を満たす行列(a_{ij} ($i=1,2,3,4$; $j=1,2,3,4$))を補正係数として算出する。

【0053】

具体的には、演算部3は、 $a_{11}=a_{22}=a_{33}=a_{44}=1$ に設定して補正係数の算出を行なう。例えば、 $a_{11}:a_{12}:a_{13}:a_{14}$ の比は、使用される蛍光色素によって決定されるため、演算部3は、 $a_{12}=J1/F1$ 、 $a_{13}=T1/F1$ 、 $a_{14}=R1/F1$ と算出する。

【0054】

同様に、演算部3は、 $a_{21}=F2/J2$ 、 $a_{23}=T2/J2$ 、 $a_{24}=R2/J2$ と算出する。また、演算部3は、 $a_{31}=F3/T3$ 、 $a_{32}=J3/T3$ 、 $a_{34}=R3/T3$ と算出する。更に、演算部は、 $a_{41}=F4/R4$ 、 $a_{42}=J4/R4$ 、 $a_{43}=T4/R4$ と算出する。

【0055】

以上により補正係数算出処理は終了する。なお、本発明において、補正係数算出処理は、蛍光測定装置の製品出荷前に行なうこともできる。この場合は、製品の出荷段階において、予め蛍光測定装置のメモリに補正係数を格納させた態様とするのが好ましい。また、この場合は、図2で示した蛍光測定処理において、ステップS1及びS2は実行しなくて良い。

【0056】

次に、図2のステップS3で示した光量に基づく出力値の補正について図4を用いて説明する。図4は、図1に示す蛍光測定装置で行なわれる光量補正值算出処理を示すフローチャートである。

【0057】

図4に示す光量補正值算出処理は、発光素子11a～11dの光量が、経時変化や環境変化によって変動すると、 $a_{11}:a_{21}:a_{31}:a_{41}$ の比、 $a_{12}:a_{22}:a_{32}:a_{42}$ の比、 $a_{13}:a_{23}:a_{33}:a_{43}$ の比、及び $a_{14}:a_{24}:a_{34}:a_{44}$ の比が影響を受け、正確な蛍光輝度が算出できなくなるのを防止するために行なわれる。

【0058】

具体的には、図4に示すように、演算部3は、最初に、補正係数を決定した時の発光素子11a、11b、11c及び11dの光量比を1:1:1:1（基準値）とした場合における現在の発光素子の光量比を、光量モニタからの信号に基づいて測定する（ステップS21）。

【0059】

次に、演算部3は、算出した光量比が1:1:1:1から変動しているかどうかを判定する（ステップS22）。変動していない場合は、演算部3は処理を終了する。一方、変動している場合は、変動幅に応じた光量補正值を算出する（ステップS23）。

【0060】

例えば、発光素子11a、11b、11c及び11dの光量比が1:2:3:4になっているとする。このとき、光量比を基準値に戻すには、各発光素子の光量をそれぞれ(1/1)倍、(1/2)倍、(1/3)倍、(1/4)倍とする必要があるので、光量補正值は(1/1)、(1/2)、(1/3)、(1/4)となる。なお、受光素子14a~14dの感度が低い場合は、光量の変動が蛍光強度に与える影響は小さくなり、感度が高い場合は、その逆となる。よって、光量補正值は、受光素子14a~14dの感度を考慮して決定するのが好ましいと言える。

【0061】

よって、演算部3は、図2のステップS7において、上記式(2)の X_1 、 X_2 、 X_3 及び X_4 の代わりに、 $(1/1)X_1$ 、 $(1/2)X_2$ 、 $(1/3)X_3$ 、及び $(1/4)X_4$ を代入して、蛍光強度 $Y_1 \sim Y_4$ を算出する。または、演算部3は、上記式(2)を満たす行列(a_{ij} ($i=1,2,3,4$; $j=1,2,3,4$))の行列要素 a_{i1} 、 a_{i2} 、 a_{i3} 、及び a_{i4} の代わりに、 $(1/1)a_{i1}$ 、 $(1/2)a_{i2}$ 、 $(1/3)a_{i3}$ 、 $(1/4)a_{i4}$ を代入して、蛍光強度 $Y_1 \sim Y_4$ を算出する。

【0062】

このように、図1に示す蛍光測定装置及び蛍光測定方法によれば、発光素子の光量の変動した場合であっても、発光素子の光量を補正して蛍光強度を算出でき

るので、蛍光測定精度をよりいっそう向上させることができる。

【0063】

なお、本発明の蛍光測定装置は、光源ユニット1及び受光ユニット2と接続されたコンピュータに、図2に示したステップS1～S7を具現化するプログラムをインストールし、このプログラムを実行することによって実現することができる。この場合、コンピュータのCPU (central processing unit) は演算部3として機能する。

【0064】

上記の実施の形態では、蛍光測定装置及び蛍光測定方法を例に挙げて説明している。但し、本発明はこの例に限定されるものではなく、吸光度測定や反射率測定を用いた測定装置や測定方法であっても良い。つまり、本発明によれば、吸収波長又は反射波長の異なる複数の色素が試料に混合されている場合であっても、上記に示したと同様にして補正係数を算出でき、透過光又は散乱光の強度を色素毎に算出できる。また、この算出された透過光の強度から吸光度を算出でき、散乱光の強度から反射率を算出できる。

【0065】

【発明の効果】

以上のように本発明の測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法によれば、試料に複数の色素、例えば蛍光色素が混合されている場合であっても、得られた蛍光強度から蛍光色素毎の実際の蛍光強度を分離することができる。このため、本発明の測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法を用いることで、従来よりも更に正確な成分分析や遺伝子診断等を行なうことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の蛍光測定装置の一例を示す構成図である。

【図2】

図1に示す蛍光測定装置で行なわれる蛍光測定処理を示すフローチャートである。

【図3】

図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる補正係数算出処理を示すフローチャートである。

【図 4】

図 1 に示す蛍光測定装置で行なわれる光量補正值算出処理を示すフローチャートである。

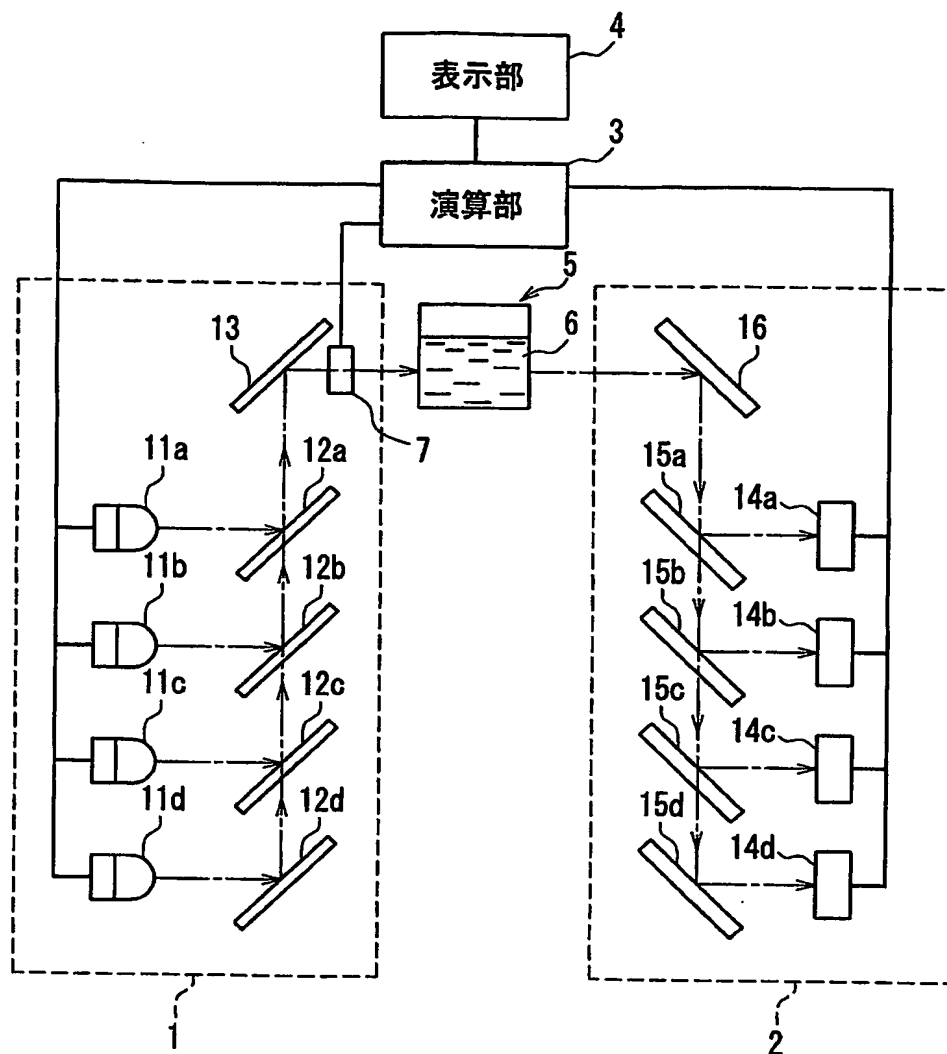
【符号の説明】

- 1 光源ユニット
- 2 受光ユニット
- 3 演算部
- 4 表示部
- 5 反応容器
- 6 試料
- 7 光量モニタ
- 11a、11b、11c、11d 発光素子
- 12a、12b、12c、12d、15a、15b、15c、15d ダイクロミックミラー
- 13、16 全反射ミラー
- 14a、14b、14c、14d 受光素子

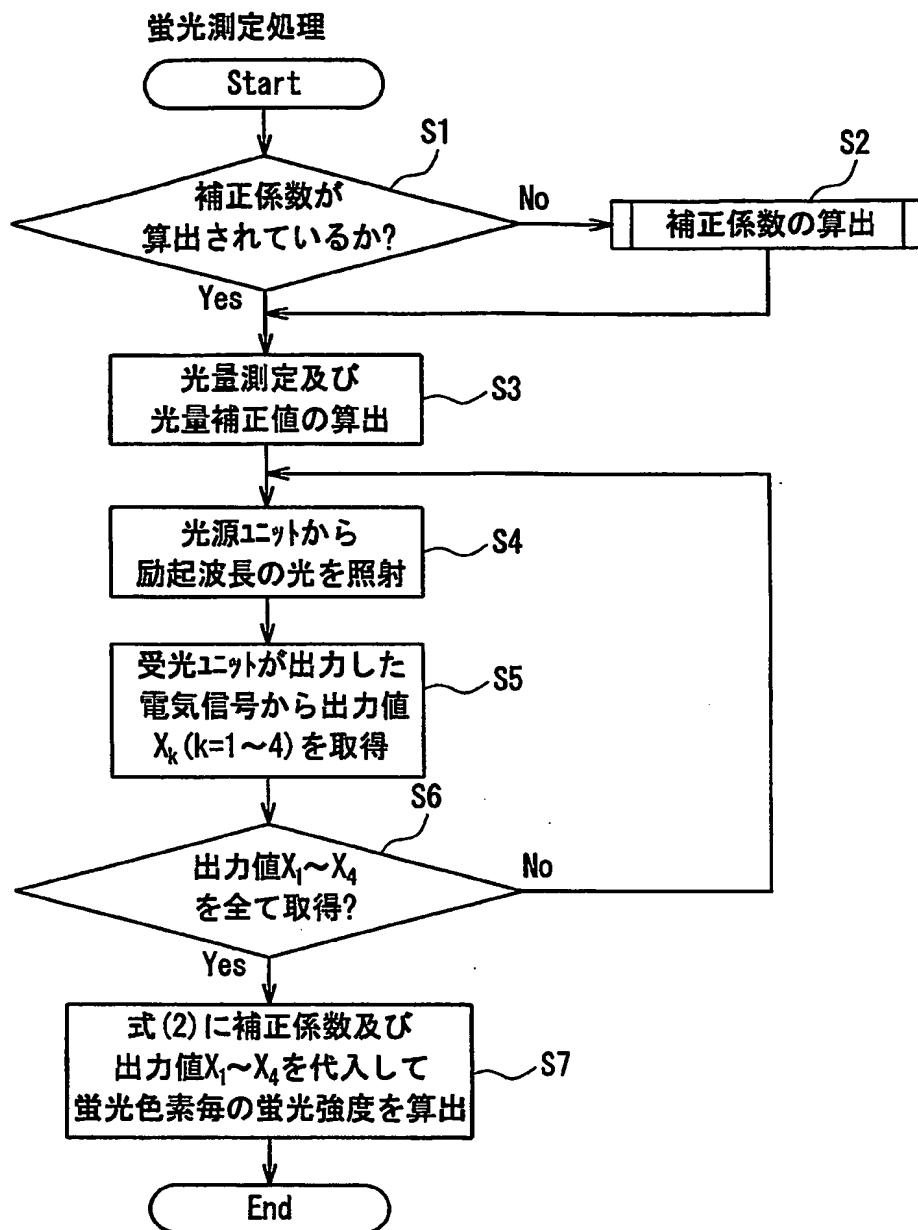
【書類名】

図面

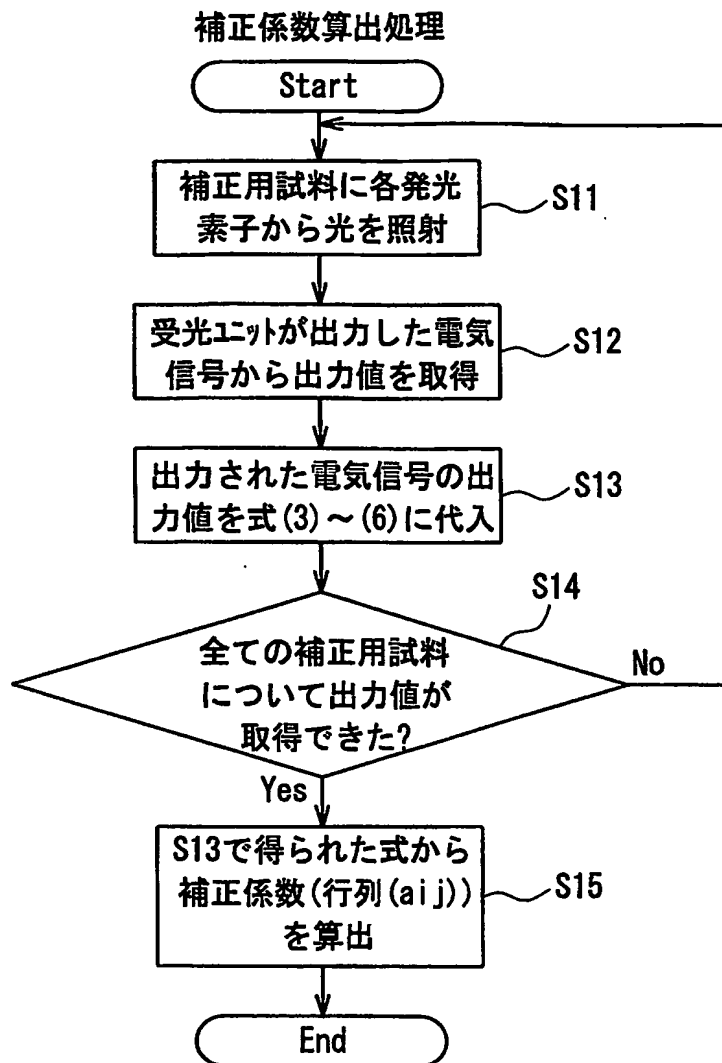
【図 1】



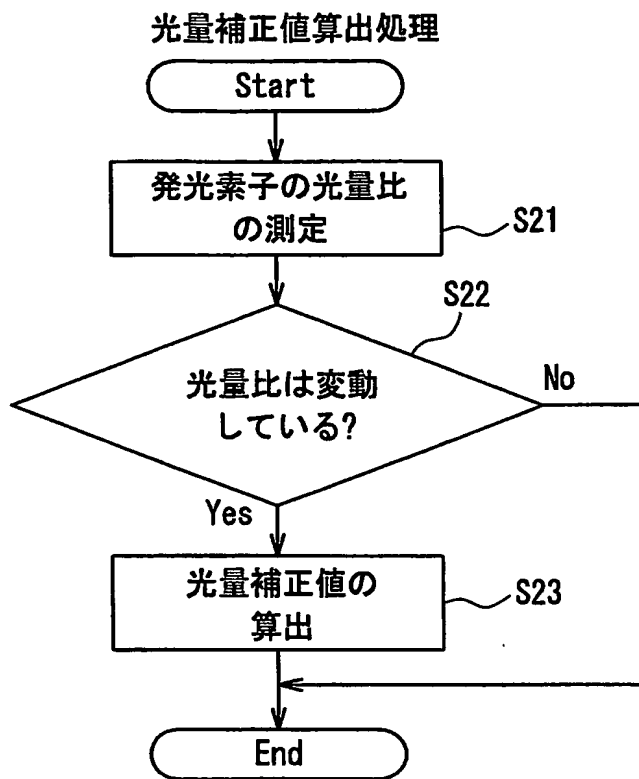
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 透過光や放射光の強度の合成値から色素毎の実際の強度を分離して測定できる測定装置、蛍光測定装置及び蛍光測定方法を提供することにある。

【解決手段】 波長の異なる光を照射可能な光源ユニット1と、複数の蛍光色素が混合された試料6から放出される蛍光の蛍光強度に応じた電気信号を出力する受光ユニット2と、演算部3とを有する蛍光測定装置を用いる。演算部3は予め算出した補正係数を用いて、蛍光色素毎の蛍光強度を算出する。補正係数は、蛍光色素のいずれか一つが混合され、混合された蛍光色素が互いに異なる複数の補正用試料それぞれに対して、蛍光色素それぞれの励起波長の光を照射したときに、受光ユニット2が出力する電気信号に基づいて算出する。

【選択図】 図1

特願 2002-330787

出願人履歴情報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

アークレイ株式会社